一株针对人 EGFR 的单链抗体克隆与哺乳细胞表达

高鑫[1] 韦攀健[2] 闫卓红[2] 易玲[2] 王小珏[1] 杨斌[2] 张洪涛[1]

(1. 101149 北京市结核病胸部肿瘤研究所中心实验室；2. 101149 首都医科大学附属北京胸科医院肿瘤免疫室)

【摘要】 **目的** 制备特异性抗人表皮生长因子受体(EGFR)的单链抗体（scFv），鉴定其生物学活性，为进一步研究基于单链抗体的免疫治疗奠定基础。**方法** 从分泌抗人 EGFR 单克隆抗体的杂交瘤细胞系提取总 RNA，利用 5’RACE 技术扩增轻链和重链可变区（V_L、V_H）基因，构建具有 V_L、V_H 基因的单链抗体基因，并将构建的单链抗体基因克隆到真核细胞表达载体 pcDNA3.1 中进行表达和鉴定。ELISA 鉴定单链抗体对抗原的特异性；Fortebio 检测抗原抗体间的亲和力，流式细胞术检测单链抗体结合肺癌细胞系天然 EGFR 的功能活性。**结果** 获得唯一的轻重链可变区序列 V_L、V_H，成功构建 EGFR-scFv，特异性与天然 EGFR 蛋白结合，亲和力达 3.22×10^{-9}mol/L。**结论** 成功构建了抗人 EGFR 单链抗体，为肺癌免疫导向治疗研究奠定了基础。

关键词： 表皮生长因子受体；单链抗体；哺乳细胞表达

Cloning And Expression Of Single Chain Antibody Against Human EGFR

Gao xin[1], Wei Pan-jian[2], Yan Zhuo-hong[2], Yi Ling[2], Wang Xiao-jue[1], Yang Bin[2], Zhang Hong-tao[1]

1.Central laboratory, Beijing Tuberculosis and Thoracic Tumor Research Institute，Beijing 101149,China；2.Department of tumor Immunology, Beijing Chest Hospital, Capital Medical University，Beijing 101149, China

【Abstract】 **Objective** Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) is overexpressed in tumors and is associated with metastasis, invasion and poor prognosis of tumor cells. Therefore, EGFR has become an attractive target for the treatment of cancer. Several small molecule compounds that specifically inhibit EGFR have been clinically developed. Preparation of specific antibody to human EGFR with an identified biological activity is essential for this target-related immunotherapeutic study, such as a construction of single chain antibody fragment (scFv). **Methods** Total RNA was extracted from the hybridoma cell line specific to EGFR. The light and

基金项目：北京市科技计划（Z151100004015104）
前两位作者对本文有同等贡献，均为第一作者
通讯作者：张洪涛，E-mail：zhtbeijing@163.com

heavy chain variable region genes VL and VH were obtained by 5 'RACE technology. The constructed scFv antibody gene was cloned into the eukaryotic expression vector pcDNA3.1. ELISA was used to detect the specificity of expressed single chain antibody to human EGFR protein. The affinity between antigen and antibody was detected by Fortibo. Flow cytometry was used to detect the functional activity of single chain antibody by which binding to natural EGFR on lung cancer cell lines. **Results** The V_L and V_H sequences of light and heavy chain variable regions were obtained, and assembled EGFR-scFv was successfully expressed. The EGFR-scFv was specifically bound to natural EGFR protein with an affinity of 3.22×10^{-9}mol/L, and the scFv was further indentified based on its binding to EGFR that expressed by lung cancer cell line H1975. **Conclusion** The anti-human EGFR single chain antibody was successfully constructed, which lays the foundation for development of EGFR- targeted immunotherapy.

【**Key words**】 epidermal growth factor receptor； single chain antibody; Mammalian cells express ;

表皮生长因子受体（Epidermal Growth Factor Receptor，EGFR）是上皮生长因子（Epidermal Growth Factor，EGF）细胞增殖和信号传导的受体，是表皮生长因子受体（HER）家族成员[1]。EGFR 是一种糖蛋白，属于酪氨酸激酶型受体，细胞膜贯通，分子量 170KDa。其在细胞生理过程中发挥重要的调节作用，EGFR 位于细胞膜表面，靠与配体结合来激活，激活后的受体转化为二聚体[2]。EGFR 二聚后可以激活它位于细胞内的激酶通路，这个自磷酸化可以引导下游的磷酸化，包括 MAPK、Akt 和 JNK 通路，最终产生细胞增殖和侵袭，抑制凋亡和新生血管形成[3]。EGFR 表达于正常上皮细胞表面，而在一些肿瘤细胞中常过表达，EGFR 的过表达和肿瘤细胞转移、侵润、预后差有关，使 EGFR 成为癌症治疗具有吸引力的靶点，临床上已经开发了多种特异性抑制 EGFR 的小分子化合物，包括靶向 EGFR 单克隆抗体（anti-EGFR mAb）西妥昔单抗、帕尼单抗[4]，以及 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂厄洛替尼、吉非替尼[5，6]，这些药物已在许多肿瘤类型的临床中用于治疗转移性非小细胞肺癌，头颈鳞状细胞癌，结肠直肠癌和胰腺癌，而且疗效显著[7]。

目前肿瘤的免疫治疗取得了突破性进展[8]，其中CAR（Chimeric antigen receptor）和TCR修饰T细胞等方法可赋予不同克隆T细胞一致的新抗原特异性，根本上解决了特异性T细胞数量不足问题,是肿瘤免疫国际前沿,具有极大的发展前景，EGFR是癌症免疫治疗的理想的靶抗原，本研究针对这一靶点旨在制备特异性抗表皮生长因子受体单链抗体,旨在为进一步研究肿瘤的细胞免疫疗法的研究提供关键工具。

1.材料和方法

1.1 材料

感受态细胞 DH5α，凝胶回收试剂盒，质粒 DNA 小、大量抽提试剂盒购自天根公司； HindIII、BamHI 等限制性内切酶、胰蛋白酶购自 Thermo 公司；琼脂糖、琼脂粉购自 Sangon 公司；辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠 lgG 购自中杉金桥公司；亚类测定试剂盒购自 Sigma 公司；RPMI1640、DMEM 及胎牛血清 FBS 购自 Gibco 公司；Expi293F 细胞系购自 invitrogen 公司；COS-7、人肺癌细胞系 H1975 及抗人 EGFR 单克隆抗体杂交瘤细胞系（HB-8509）购自 ATCC 细胞库。

1.2 EGFR 蛋白表达鉴定及抗人 EGFR 单克隆杂交瘤细胞上清的鉴定

参考人 EGFR 基因设计上下游 PCR 引物，使用 PCR 从人肺腺癌细胞系 H1975 的总 DNA 提取物中克隆 EGFR 基因，并在真核细胞表达载体 pcDNA3.1 中表达 EGFR-C 端融合人 Fc 蛋白。收集上清，做蛋白印迹实验鉴定，纯化蛋白备用。抗人 EGFR 单克隆杂交瘤细胞购自美国典型培养物储藏中心（ATCC），该细胞分泌抗人 EGFR 鼠源单克隆抗体。培养杂交瘤细胞并收集上清，使用表达的 EGFR 蛋白包被酶联免疫吸附法（ELISA）检测抗人 EGFR 单克隆抗体的效价并纯化上清中抗体。利用亚类测定试剂盒检测杂交瘤细胞分泌的抗体亚型。

1.3 杂交瘤的 DNA 测序

从杂交瘤细胞中提取细胞的总 RNA,利用 RT-PCR 方法,使用亚类特异性的引物或者通用引物，按照 5’RACE 的方法，分别扩增信号肽的重链和轻链可变区的基因。利用凝胶纯化目的基因片段，并分别克隆到测序载体中，对每条链筛选出大于 5 个阳性单克隆并进行测序，最终得到一致性序列。

1.4 单链抗体在真核细胞中的表达及鉴定

经过单克隆抗体序列的测定得到抗人 EGFR 单克隆抗体的轻重链序列。根据小鼠可变区序列排除骨架区序列后即可得到其互补决定区序列;将上述可变区序列中的轻重链可变区连接并克隆到真核细胞表达载体 pcDNA3.1(+)中，最终转染 Expi293F 细胞系。转染前一天接种细胞，转染当天将细胞离心收集细胞，将细胞重悬于新鲜培养基中，细胞密度为 20×10^6 细胞/mL,细胞在定轨摇床中以 37℃下 8%CO_2 的条件下培养。在转染当天，以最佳比例混合 DNA 和转染试剂，然后加入准备转染细胞的锥形培养瓶中。将编码 scfv 的重组质粒瞬时转染到 40ml 悬浮的 Expi293F 细胞中。取第 2 天、第 4 天和第 6 天收集的细胞培养上清液用 ELISA 及 Western blot 法检测单链抗体的分泌和表达。以先期制备的 EGFR-Fc 蛋白（2μg/mL）包被 ELLSA 板，50g/L 牛奶封闭后，加入纯化的单链抗体（连续 10 倍浓度稀释）100μl，4℃过夜；以 0.5 mL/LPBST 洗板后，单链抗体带有 His 标签，依次加入鼠抗 His 二抗、HRP 标记山羊抗鼠三抗，37℃孵育 2h,TMB 显色，2mol/L 硫酸终止反应后酶标仪读数。

蛋白印迹试验分析单链抗体表达。EGFR-Fc 蛋白行 SDS-PAGE 后，用电转系统湿转，丽春红染色。50g/L 牛奶封闭，依次用单链抗体一抗（1μg）、鼠抗 His 二抗、HRP 标记山羊抗鼠三抗孵育。ECL 显色鉴定单链抗体的表达。

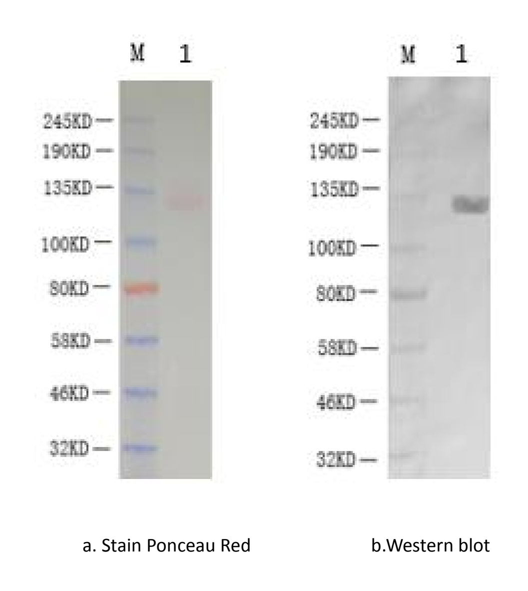
1.5 评估单链抗体生物活性

使用分子相互作用仪（Fortebio）测定不同浓度下单链抗体与 EGFR 蛋白间的结合和解离值，以单链抗体初始浓度 200nm/孔，10 倍梯度稀释，最终求得 Kd 值。流式细胞术检测单链抗体与具有天然 EGFR 抗原的人肺癌细胞 H1975 的结合能力，以单链抗体为一抗，二抗选用抗 His 荧光抗体。

2. 结果

2.1 EGFR 蛋白的合成与鉴定

重组人 EGFR/Fc 蛋白由 860 个氨基酸分子组成，其理论分子量为 95KDa。收集转染细胞上清使用重组蛋白质 A 琼脂糖凝胶在 4℃过夜纯化，在还原条件下通过蛋白质印迹分析可得知靶蛋白分子量约 130kDa,见图 1。大量制备并纯化重组人 EGFR/Fc 蛋白用于下一步实验。



M:Mark;1:cell culture supernatant under reducing conditions

图 1：重组人 EGFR/Fc 蛋白表达蛋白印迹试验结果

Figure 1: Western Blot of recombinant human EGFR / Fc protein expression

2.2 杂交瘤细胞分泌单抗的鉴定

培养抗人 EGFR 单克隆杂交瘤细胞收集培养上清，使用 ELISA 检测杂交瘤分泌的抗人 EGFR 单克隆抗体效价。经检测杂交瘤细胞分泌的抗体亚型为 lgG2a。经 ELISA 鉴定该抗人 EGFR 单克隆抗体与 EGFR 蛋白能特异性结合，效价高，该杂交瘤可用于 DNA 序列测序。

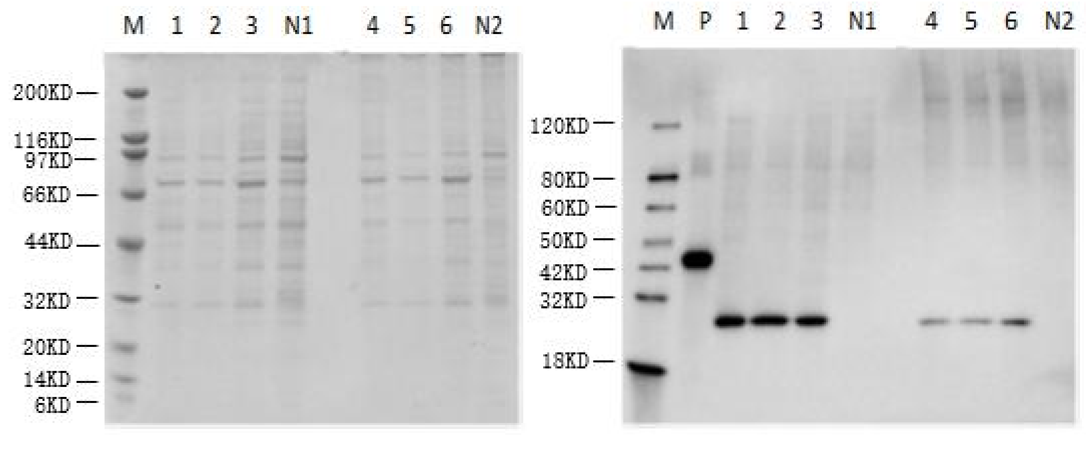
2.3 杂交瘤细胞株的 DNA 序列测定

对抗人 EGFR 单克隆抗体进行轻、重链可变区测序，结果显示轻、重链可变区基因序列在挑取的 5 个克隆中均一致。轻链基因由 393bp 组成，编码 131 个氨基酸，其中可变区的三个互补决定区 CDR-1、CDR-2、CDR-3 的分别由 48bp、21bp、27bp 组成。重链基因由 411bp 组成，编码 137 个氨基酸，其中可变区的三个互补决定区 CDR-1、CDR-2、CDR-3 的分别由 15bp、51bp、27bp 组成。将轻链和重链可变区序列，优化并用 linker 连接，并在 C 端引入 His-tag，最终得到抗 EGFR/His 融合蛋白单链抗体序列，并在 5’端和 3’ 端分别引入 HindIII 与 BamHI 酶切位点，对轻、重链可变区的 25%的碱基进行密码子优化更替，通过酶切将 ScFv 基因亚克隆到 pcDNA3.1 载体。

2.4 单链抗体在真核细胞中的表达及鉴定

用带有 scFv 序列的载体 pcDNA3.1 转染 Expi293F 细胞。收集第 2 天、第 4

天和第 6 天的细胞培养上清液用于蛋白质表达评估。其中 SDS-PAGE 和 Western 印迹分析结果如图 2。



a.SDS-PAGE

b.Western blot

M: Marker;1-3: Cell culture supernatant from day 2, 4 and 6 post-transfection under a reducing condition; N1: Negative control under a reducing condition：Negative control under a reducing condition;4-6: Cell culture supernatant from day 2, 4 and 6 post-transfection under a non-reducing condition; N2: Negative control under a non-reducing condition;P: Multiple-tag as positive control.

图 2：单链抗体表达蛋白印迹试验结果

Figure 2.SDS-PAGE(left)and Western blot(right)analysis of cell culture supernatant of scfv

根据图 2 所示，在 Expi293F 细胞培养上清中发现有 scfv 的表达。在还原与非还原条件下通过蛋白质印迹分析可得知靶蛋白分子量约 30kDa（理论值 27.49 kDa）。在非还原条件下> 120kDa 的条带应该是靶蛋白 scfv 的同源寡聚体。目标蛋白的表达水平约为 1mg/L。将 Expi293F 细胞培养上清纯化后进行 ELISA 法检测。使用抗原 EGFR 蛋白包被 ELISA 板，检测结果见图 3。

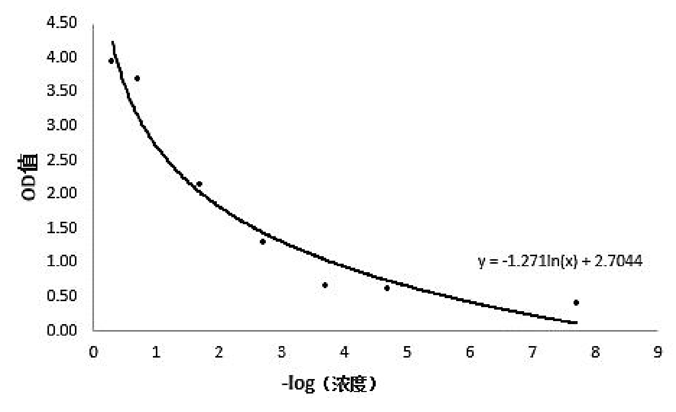
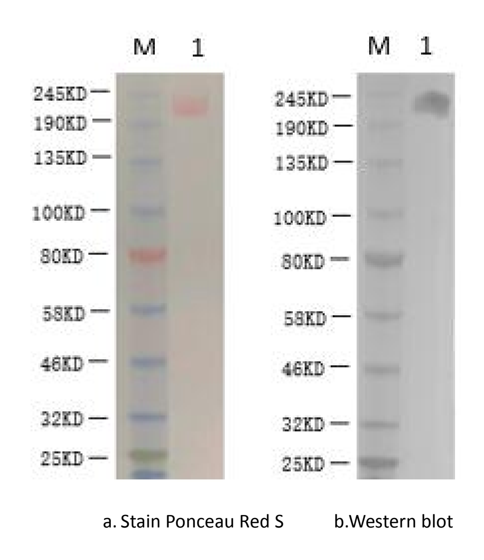


图 3：单链抗体 ELISA 检测

Figure 3: ELISA assay of scfv

非还原条件下人 EGFR/Fc 蛋白条带大小约 200KDa，单链抗体可以特异性结合此条带上的 EGFR 蛋白，蛋白印迹试验结果如图 4 所示。



a. Stain Ponceau Red S　　b.Western blot

M: Marker；1: Cell culture supernatant under a reducing condition

图 4：单链抗体鉴定蛋白印迹试验

Figure 4: Western blotting of scfv

2.5 单链抗体生物活性检测

抗原和抗体结合亲和力是工程抗体的重要功能参数指标。利用分子相互作用仪（Fortebio）检测不同浓度下抗体的 k_{on} 和 k_{off} 值，从而计算 K d 值：经检测计算出 KD 值为 3.22×10^{-9}mol/L，亲和力良好，如图 5 所示。

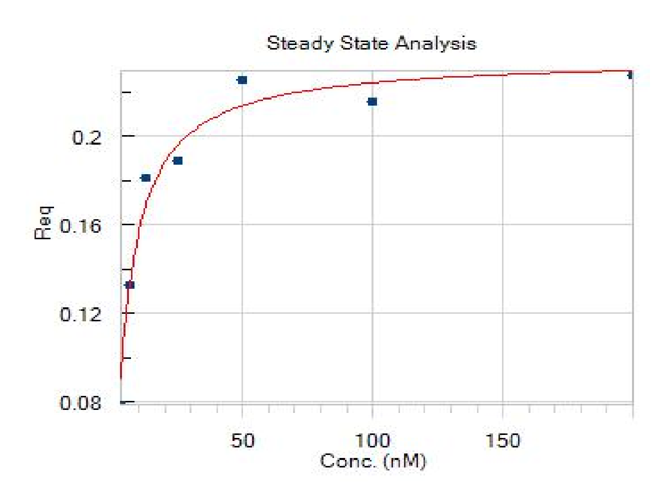
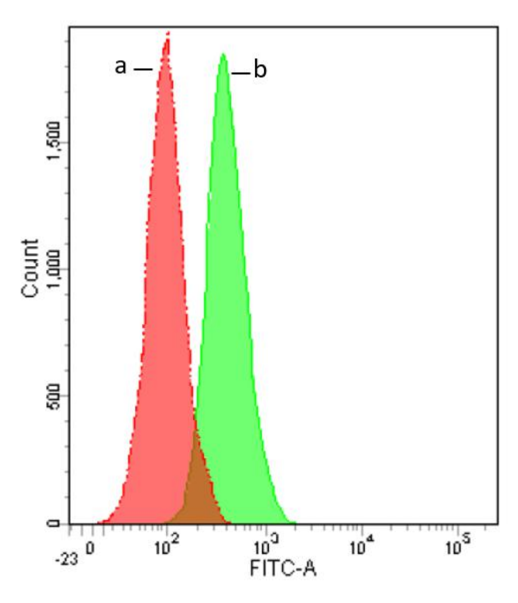


图 5：单链抗体与抗原间亲和力测定

Figure 5: Affinity of scFv to human EGFR protein

通过流式细胞术检测特异性结合肺癌细胞系 H1975 膜表达的 EGFR 活性，借助抗 His 荧光抗体，流式分析可看到 H1975 细胞比阴性对照荧光强度明显增强，见图 6。



a: Negative control ; b:H1975+scfv+ Anti-His fluorescent antibody

图 6：流式细胞术检测单链抗体结合肺癌细胞系

Figure 6: scFv binding to lung cancer cell by Flow Cytometry analysis

3. 讨论

自 Kohler 等创造出杂交瘤技术以来，凭借着单克隆抗体的优良生物效应在免疫学研究、临床诊断和治疗方面发挥了巨大作用[9]。现在应用的单克隆抗体多为鼠源性，是使用过程中有诸多缺点，诸如完整抗体相对分子质量较大，在体内应用时难以穿越血管进入靶部位；鼠源性抗体在人体应用是会出现交叉反应等。目前通过基因工程技术制备的单链抗体 scFv 则可以极大避免上述问题。

单链抗体只保留有抗原特异性结合的抗体可变区，去除了种属差异较大的抗体恒定区，仅只有完整抗体的 1/6，相对分子质量小，容易通过血管壁，容易穿透实体瘤，是导向药物首选的载体；其次单链抗体免疫原性弱，不易引起超敏反应和排斥反应；单链抗体无 Fc 段，不与非靶细胞的 Fc 受体结合，在影像分析中非特异性少；单链抗体在体内清除快，用作造影时对周围组织损伤小；单链抗体易抗体的于构建和表达，易于大批量制备等优点[10]，凭借这些优点单链抗体是目前研究最活跃的基因工程抗体之一。单链抗体与毒素或免疫效应分子通过 DNA

重组工程制备的融合蛋白以及胞内表达的单链抗体等在疾病研究与治疗方面有很大的应用潜力，EGFR 单链抗体具有良好的恶性上皮来源肿瘤导向性，EGFR 单链抗体修饰的 T 细胞靶向肿瘤治疗也是国际研究热点之一[11]。

本研究选用稳定的杂交瘤细胞系，克隆出抗EGFR单克隆抗体的重链可变区和轻链可变区基因，将抗体的轻链和重链可变区基因优化并通过一段柔性肽(linker)连接得到抗EGFR单链抗体，此单链抗体基因克隆至载体pcDNA3.1，用于转染Expi293F细胞进行表达测定，表达产物下游串联了一个能够编码His—Tag的序列作为标志蛋白，经过纯化后得到的高纯度蛋白可以特异性与人EGFR抗原结合。在单链抗体的蛋白印迹实验中，我们发现人EGFR/Fc蛋白只有在非还原条件下才能与抗EGFR单链抗体特异性结合显现条带，在还原条件下未出现条带。表明本单链抗体结合EGFR蛋白为空间结构，并且该单链抗体能有效结合表达EGFR的肺癌细胞系。与市场上商品化的靶向EGFR单克隆抗体相比，本单链抗体，与其它人EGFR抗体的抗原结合的位点不同，具有独特性，其亲和力为10^{-9}数量级，具有中等亲和力，有潜在封阻与EGF结合的功能，中等亲和力的单链抗体导向淋巴细胞抗肿瘤治疗具有更好安全性预期，目前国际上已有靶向人EGFR的嵌合抗原抗体相关临床研究，本研究也使得该单链抗体Fc段全人源化改造及其单链抗体自身进一步人源化成为可能。总之，本研究的抗体可变区克隆、单链抗体的构建、序列优化及表达鉴定体系，为其他工程化单链抗体的制备和EGFR导向的免疫治疗研究奠定了基础。

参考文献

[1] Salomon D S, Brandt R, Ciardiello F, et al. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 1995,19(3):183-232.

[2] Citri A, Yarden Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006,7(7):505-516.

[3] Hynes N E, Lane H A. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors[J]. Nat Rev Cancer, 2005,5(5):341-354.

[4] Hubbard J M, Alberts S R. Alternate dosing of cetuximab for patients with metastatic colorectal cancer[J]. Gastrointest Cancer Res, 2013,6(2):47-55.

[5] Cho S H, Park L C, Ji J H, et al. Efficacy of EGFR tyrosine kinase inhibitors for non-adenocarcinoma NSCLC patients with EGFR mutation[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2012,70(2):315-320.

[6] Fang W, Zhang J, Liang W, et al. Efficacy of epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors for Chinese patients with squamous cell carcinoma of lung harboring EGFR mutation[J].

J Thorac Dis, 2013,5(5):585-592.
[7] Ciardiello F, Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment[J]. N Engl J Med, 2008,358(11):1160-1174.
[8] Couzin-Frankel J. Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy[J]. Science, 2013,342(6165):1432-1433.
[9] Libermann T A, Nusbaum H R, Razon N, et al. Amplification, enhanced expression and possible rearrangement of EGF receptor gene in primary human brain tumours of glial origin[J]. Nature, 1985,313(5998):144-147.
[10] Yokota T, Milenic D E, Whitlow M, et al. Rapid tumor penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms[J]. Cancer Res, 1992,52(12):3402-3408.
[11] Liu X, Jiang S, Fang C, et al. Affinity-Tuned ErbB2 or EGFR Chimeric Antigen Receptor T Cells Exhibit an Increased Therapeutic Index against Tumors in Mice[J]. Cancer Res, 2015,75(17):3596-3607.